



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Pneumologia

### **Discinésia Ciliar Primária – Novos conceitos na abordagem diagnóstica**

Gina Patrícia Paradela Gouveia

---

**JULHO 2017**



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Pneumologia

### **Discinésia Ciliar Primária – Novos conceitos na abordagem diagnóstica**

Gina Patrícia Paradela Gouveia

#### **Orientado por:**

Dra. Maria do Pilar Azevedo Cardim

---

**JULHO 2017**

## RESUMO

A discinesia ciliar primária é uma doença genética autossómica recessiva, em que o incorreto funcionamento ciliar presente acarreta uma dificuldade acrescida na remoção de secreções e microrganismos, resultando numa variabilidade de sintomas que vão desde infeções recorrentes do trato respiratório a vários sintomas extra- torácicos como rinossinusite, otite média aguda e subfertilidade.

No entanto, apesar de existirem atualmente vários testes diagnósticos sofisticados, esta patologia é frequentemente subdiagnosticada e uma das razões é a ausência de um teste de referência “*gold standard*”.

Atualmente os testes de diagnóstico usados são o teste do óxido nítrico nasal, a análise da frequência e padrão de batimento ciliar por análise de vídeo – microscopia de alta velocidade, a microscopia electrónica de transmissão, a imunofluorescência e a genotipagem.

Uma *Task Force* reuniu – se e realizou uma revisão sistemática da literatura disponível, para à luz da evidência científica poder formular recomendações que ajudarão os clínicos a confirmar ou a excluir definitivamente esta doença.

O resultado foi a elaboração de um algoritmo baseado na utilização da abordagem *GRADE* e de uma *pesquisa Delphi modificada*.

Assim sendo, este artigo de revisão abordará e explorará a *guideline* desta última *Task Force* (2016) para a Discinésia Ciliar Primária apoiada pela *European Respiratory Society*.

Palavras – chave: Discinésia Ciliar Primária, disfunção ciliar

Este trabalho exprime a opinião do autor e não da Faculdade de Medicina de Lisboa.

## ABSTRACT

Primary ciliary dyskinesia is an autosomal recessive genetic disease in which the incorrect ciliary functioning present an increased difficulty in the removal of secretions and microorganisms, resulting in a variability of symptoms ranging from recurrent respiratory tract infections to various extra-thoracic symptoms such as rhinosinusitis, acute otitis media and subfertility.

However, although there are currently several sophisticated diagnostic tests, this pathology is often underdiagnosed and one reason is the absence of a gold standard reference test.

At present the diagnostic tests used are nasal nitric oxide test, frequency analysis and ciliary beat pattern by high - speed video - microscopy analysis, transmission electron microscopy, immunofluorescence and genotyping.

A Task Force met and carried out a systematic review of available literature, in the light of scientific evidence to be able to formulate recommendations that will help clinicians definitively confirm or exclude this disease.

The result was the elaboration of an algorithm based on the use of the *GRADE* approach and a *modified Delphi survey*.

Therefore, this review will address and explore the guideline of this last Task Force (2016) for Primary Ciliary Dyskinesia, supported by the *European Respiratory Society*.

Key – Words: Primary ciliary dyskinesia, ciliary dysfunction

This work expresses the opinion of the author and not of the Faculty of Medicine of Lisbon

## ÍNDICE

	Páginas
Resumo	ii
Abstract	iii
Declaração	vi
Agradecimentos	vii
Siglas e abreviaturas	viii
Introdução	1
Função e estrutura ciliar	3
Apresentação clínica	5
Perspetiva histórica	7
Abordagem diagnóstica prévia	9
<i>Task Force</i> e Métodos	11
Recomendações	13
Algoritmo de diagnóstico	15
Os seis métodos diagnósticos	17
Descrição da metodologia	23
Discussão	25
Conclusão	26
Bibliografia	27
Anexos	29

Trabalho Final do Mestrado Integrado em Medicina, apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Medicina, realizado sob a orientação da Dr.a Maria do Pilar Azevedo Cardim.

Este trabalho foi escrito em conformidade com o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este trabalho resulta da minha pesquisa pessoal e independente e que o seu conteúdo é original, estando as fontes consultadas devidamente identificadas na bibliografia.

Este trabalho exprime a opinião do autor e não da Faculdade de Medicina de Lisboa.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Dra. Pilar Cardim, pela disponibilidade na tutela deste trabalho e pela sua revisão crítica.

Agradeço também à minha família por me acompanharem durante o meu percurso académico.



## **SIGLAS E ABREVIATURAS**

DCP – Discinésia Ciliar Primária

SRE - Sociedade respiratória europeia

TEM: transmission electron microscopy

HSVA: high-speed video microscopy analysis.

CBF/P: ciliary beat frequency/pattern;

ALI: air–liquid interface.

nNO: óxido nítrico nasal

## INTRODUÇÃO

A Discinesia Ciliar Primária (DCP) é uma doença genética heterogénea que quase invariavelmente apresenta um padrão hereditário autossómico recessivo, embora numa pequena minoria também possa ter uma hereditariedade ligada ao cromossoma X [1].

Sendo uma doença genética heterogénea várias mutações estarão envolvidas. Esta diversidade de mutações reflete – se numa ampla possibilidade de apresentações clínicas, o que dificulta o diagnóstico. É conhecida a implicação dos cromossomas 6, 7 e 19 na patogénese da doença.

Especialistas pensam que a Discinesia Ciliar Primária está subdiagnosticada uma vez que os sintomas apresentados por esta entidade clínica podem ser confundidos com o de outras doenças pulmonares, originando um diagnóstico incorreto, particularmente em crianças. Assim sendo, o valor da prevalência será superior ao que consta na bibliografia. Alguns autores sugerem que o valor seja de 1 por 10 000 nascimentos, outros de 1 em 15- 30 000 indivíduos.

Sabe – se também que esta entidade clínica não apresenta preferência por nenhum grupo racial ou sexo, sendo no entanto mais comum em casos de consanguinidade.

A DCP tem por base fisiopatológica a anormal estrutura ou a função ciliar, o que origina um batimento ciliar anormal, dificultando a depuração mucociliar. Assim sendo, ocorre a acumulação de secreções que predisporarão ao aumento do número de infeções respiratórias e a longo prazo ao declínio da função pulmonar. Esta entidade clínica pode também manifestar - se por sinusopatia crónica, otites médias agudas de repetição, bronquiectasias e subfertilidade.

Devido a esta diversidade de apresentações clínicas e à falta de consenso quanto às diretrizes para o diagnóstico, torna- se necessário avaliar os testes de diagnóstico atualmente disponíveis e fazer uma revisão sistemática da literatura existente.

É importante obter orientações baseadas em evidências, saber quem referenciar para teste de diagnóstico, como confirmar/excluir o diagnóstico definitivamente e saber fornecer conselhos adequados em caso de diagnóstico não conclusivo. Para atingir estes objetivos foi formada uma *Task Force* (em 2016) por um grupo multidisciplinar de clínicos e cientistas com conhecimentos reconhecidos no diagnóstico de DCP, que deu origem à

mais recente *guideline* para o diagnóstico da DCP. Esta tese vai assim abordar essencialmente os resultados a que chegaram este grupo de peritos.

Foram analisados os seguintes aspetos diagnósticos: sintomas apresentados, valor do óxido nítrico nasal (*nNO*) e resultados da vídeo - microscopia de alta velocidade (*HSVA*), da microscopia eletrónica de transmissão (*TEM*), da genotipagem e da imunofluorescência. Foi recolhida toda a bibliografia relevante e realizada a sua análise, possibilitando assim a elaboração de recomendações.

Com estas recomendações tornou – se mais fácil a confirmação ou exclusão do diagnóstico onde anteriormente existiam dúvidas. Isto possibilita um diagnóstico e tratamento mais precoces, o que é benéfico, já que quanto mais cedo é iniciado o tratamento melhor é o prognóstico.

## FUNÇÃO E ESTRUTURA CILIAR

Os cílios são projeções celulares que possuem uma forma semelhante a pêlos e cada célula ciliada possui aproximadamente 200 cílios de tamanho semelhante. Estes prolongamentos têm aproximadamente 0,25 mm de diâmetro e 5 a 7 mm de comprimento.

Cada cílio é composto pelo aparelho basal e haste ciliar de estrutura tubular, unidos por uma zona de transição. O aparelho basal confere estabilidade e estabelece a orientação ciliar.

A estrutura tubular que tem o nome de axonema é formada por uma membrana celular externa que rodeia um conjunto de microtúbulos longitudinais. Estes microtúbulos são compostos por nove pares de microtúbulos periféricos e dois microtúbulos centrais, organizados sob o padrão característico “9 + 2”.

Os microtúbulos periféricos são divididos em A e B.

Cada “microtúbulo A” é dotado de dois braços de dineína, dispostos em sentido horário e classificados em internos e externos. O braço externo é responsável pela frequência dos batimentos e o interno determina o tipo de forma de onda dos movimentos.

Os dois braços são assimétricos e têm composições polipeptídicas diferentes. A dineína é uma proteína presente nos braços dos microtúbulos, responsável pela liberação de energia necessária ao deslizamento, por atuar na hidrólise de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP). A ligação entre os pares de microtúbulos periféricos é realizada por um filamento fino composto de uma proteína denominada nexina.

O cílio possui ainda outras estruturas: bainha central, espículas radiais e capuz ciliar.

Os flagelos são estruturalmente semelhantes aos cílios, apresentando no entanto algumas diferenças como a presença de alguns elementos adicionais e padrões diferentes de movimento.

Estes organelos microscópicos têm como função mobilizar as secreções através de movimentos coordenados, limpando assim as vias aéreas do muco, bactérias e detritos. Para tal, os cílios executam movimentos ondulatórios, movendo - se em média 20 vezes por segundo.

Pensa – se que a força motriz resida nos braços de dineína dos microtúbulos periféricos. Sendo a dineína uma APTase, ela é a responsável pela hidrólise do ATP, retirando desta

reação química a energia necessária ao movimento. Estes braços de dineína estão tanto envolvidos quer no movimento efetivo quer no de recuperação, correspondendo 1/5 do ciclo ao movimento efetivo e 4/5 do ciclo ao movimento de recuperação.

O movimento ciliar permite que o tapete mucoso se mova a uma velocidade de 0,25 a 1mm por minuto, em direção ascendente. Tal possibilita que uma partícula aderente a nível da junção bronquíolo-alveolar atinja a faringe em 20 a 30 minutos.

O anormal funcionamento ciliar tem por base muitas vezes uma estrutura ciliar anormal. Assim sendo, torna – se necessário tomar conhecimento do que corresponderá a uma ultraestrutura normal antes de poder fazer o diagnóstico do defeito ciliar.

O movimento mucociliar está alterado na presença de anormalidades ultraestruturais. Algumas das mais importantes são: defeito ou mesmo ausência nos braços de dineína (no braço interno, externo ou ambos), microtúbulos duplos supranumerários ou mudança na posição dos microtúbulos periféricos para a região central, defeito nas espículas basais ou no aparelho basal, ausência das estruturas constituintes do axonema, presença de cílio respiratório curto ou desorientação ciliar.

A alteração no transporte mucociliar predispõem a estase das secreções no trato respiratório e suas conseqüentes manifestações clínicas.

Seios perinasais, ouvido médio e todo o trato respiratório (desde o terço posterior das fossas nasais até aos bronquíolos) são revestidos por epitélio colunar pseudo-estratificado ciliado.

Mas os cílios estão também presentes em outros locais para além dos já descritos: estão presentes nos prolongamentos das células retinianas, no aparelho reprodutivo feminino (trompas de falópio e endométrio do cérvix), aparelho reprodutivo masculino (ductos deferentes) e epêndima do cérebro.

Uma vez que o defeito ciliar se encontra não só nos cílios respiratórios, as infeções recorrentes e crónicas do trato respiratório superior e inferior não são a única apresentação clínica, podendo coexistir rinosinusite, otite média aguda (que poderá evoluir para deficiência auditiva) e subfertilidade. Assim sendo, sintomas não torácicos estão presentes na maioria dos pacientes.

## APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Os sintomas iniciam – se já no recém – nascido com a presença de dificuldade respiratória, com envolvimento da via aérea superior e sintomas nasais (sobretudo a presença de rinorreia contínua). Esta rinorreia frequentemente inicia - se no primeiro dia de vida. Também podem ocorrer: taquipneia, hipoxia, pneumonia neonatal e distúrbios da lateralidade. Outras características menos comuns passíveis de estarem presentes são: defeitos cardíacos congénitos complexos, hidrocefalia, atresia biliar e alterações esofágicas.

A apresentação clínica é diferente nos lactentes e crianças mais velhas. Neste grupo é marcada a presença de infeções recorrentes do trato respiratório superior e inferior, de tosse produtiva crónica e rinosinusite crónica. É também bastante comum a congestão e corrimento nasal (que se fazem muitas vezes acompanhar por fala anasalada e respiração bucal); atingimento do ouvido médio, com otite média de repetição e pólipos nasais (estando estes últimos presentes em aproximadamente 1/3 dos doentes).

Com a progressão da doença surgem complicações como hipocratismo digital, bronquiectasias e déficit de crescimento.

Os adolescentes e adultos não têm uma forma de apresentação muito diferente das crianças jovens. Nestes geralmente a doença caracteriza – se por tosse produtiva crónica, otites médias de repetição e sinusopatia crónica.

Na idade adulta as bronquiectasias estão presentes na quase totalidade dos doentes. No entanto, a apresentação clínica é variável e alguns apenas apresentam subfertilidade e infertilidade.

Uma percentagem significativa de homens é fértil. No entanto, a dismotilidade do flagelo presente na cauda dos espermatozoides ou a discinesia ciliar das células epiteliais dos vasos deferentes poderão estar na base de infertilidade. A estes defeitos poder – se -á acrescentar uma possível oligospermia.

Nas mulheres a dismotilidade dos cílios das trompas de Falópio acarreta subfertilidade ou aumento da probabilidade de ocorrência de gravidez ectópica.

Cefaleias de forte intensidade podem também ocorrer: podem ficar – se a dever a infeções crónicas dos seios perinasais ou à disfunção ciliar que provoca a diminuição da circulação do líquido cefalo - raquidiano.

A DCP também se associa muito frequentemente à presença de *situs inversus*. Pensa – se que *situs inversus totalis* (isto é, inversão de todos os órgãos abdominais e torácicos) ocorra em quase 50% dos doentes com DCP e que a heterotaxia (*situs ambíguo*) ocorra unicamente em 6%. A incidência de *situs inversus* parece ser ocasional e a sua origem poderá estar na incapacidade de rotação visceral para a correta posição anatómica causada pela disfunção ciliar das células embrionárias. A origem desta disfunção ciliar reside mais frequentemente nos braços de dineína.

A Discinesia ciliar primária pode ainda ser encontrada em associação com alguns síndromes genéticos. São eles: Síndrome de Young, Síndrome de Kartagener e Síndrome de Usher.

## PERSPECTIVA HISTÓRICA

Já em 1904, Siewert relatou o caso de uma doente com bronquiectasias, sinusite e *situs inversus*. Em 1933, Manes Kartagener considerou que esta tríade de sintomas (tríade de kartagener) constituiria uma entidade clínica própria, sendo denominada por Síndrome de Kartagener.

Esta síndrome autossômica recessiva, para além do conjunto de sintomas já descritos, teria outras anomalias associadas, como estenose pilórica e transposição dos grandes vasos.

Com o uso de microscopia de luz e *TEM* foi possível examinar a ultraestrutura ciliar, possibilitando a deteção de deficiências nos braços de dineína que se associavam clinicamente a infeções pulmonares recorrentes e a infertilidade (com espermatozóides imóveis), surgindo assim o termo “Síndrome dos cílios imóveis” [2].

Mais recentemente, foi possível concluir que a maioria dos cílios não eram imóveis, mas teriam sim movimento descoordenado, defeitos de orientação ou diminuição da frequência de batimento, razão pela qual o nome terá sido mudado para “Discinesia ciliar primária”. [3]

Nos anos de 1980 foi possível a identificação de diferentes defeitos ultraestruturais como a ausência de braços externos e/ou internos de dineína, através do uso da *TEM*. Na década seguinte foi descoberta a associação entre a DCP e a presença de níveis baixos de óxido nítrico [4]. Isto levou à introdução da medição do *nNO* como teste de diagnóstico, sendo a sua medição relativamente simples. Ainda é desconhecido o mecanismo fisiopatológico subjacente a esta alteração [5], no entanto são raros os doentes com DCP que possuem níveis normais (uma exceção será o caso de mutação no gene *RSPH1*, que apresenta níveis normais de *nNO* [6]). Sabe-se também que os níveis de *nNO* são baixos em crianças com menos de 2 anos e em doentes com Fibrose Quística (no entanto nunca atingem valores inferiores a 30 nL/ min, como os registados na DCP [7,8]). Os valores de *nNO* também podem estar diminuídos durante infeções agudas das vias aéreas.

A partir de 1999 e até aos nossos dias, têm sido descobertos uma grande variedade de genes (mais de 30 genes [9]) associados à DCP. No entanto, ainda estão por descobrir um grande número, sendo que atualmente aproximadamente 30% dos genes não são detetados. A sequenciação destes genes permite a expansão do conhecimento sobre este



tema, contribuindo também para aplicação destes conhecimentos à prática médica com melhoria dos resultados clínicos.

Em 2003, o acoplamento de uma câmara de vídeo de alta velocidade a um microscópio de luz permitiu a identificação de diferentes padrões de batimento ciliar. Ficando também demonstrado que certos padrões estão associados a defeitos ultraestruturais específicos [10]. No entanto, poderão ser detetados defeitos que não se ficam a dever à DCP mas a defeitos infecciosos/inflamatórios ou mesmo a incorreta manipulação da amostra ou danos durante a biópsia. Nestes casos, para diferenciar os defeitos primários dos secundários pode -se realizar a repetição do teste, a reanálise após cultura em interface ar – líquido [11] ou em submersão [12]. A análise por *HSAV* exige uma ampla experiência na interpretação de defeitos secundários em células não saudáveis assim como em defeitos associados a DCP.

Atualmente a *HSAV* é o teste central para diagnóstico de DCP, detetando a quase totalidade das anormalidades no padrão de batimento ciliar. A confirmação do resultado requer repetição do teste *HSAV* passados 3-6 meses ou reanálise após cultura em interface ar – líquido (*ALI*) [11]. Este lugar de destaque não é ocupado pela *TEM* pois não é capaz de detetar 30% dos casos, ficando reservado à *TEM* a função de contribuir com informações de diagnóstico adicionais.

Já a genotipagem trata -se dum exame que requer a compra e manutenção de equipamento caro, sendo geralmente conduzida em âmbito de investigação.

Nenhum teste dos que foram apresentados é perfeito para diagnosticar isoladamente DCP, sendo necessária uma combinação dos testes disponíveis.

## ABORDAGEM DIAGNÓSTICA PRÉVIA

Por ainda não estar protocolado o uso destes recursos disponíveis, tornou – se necessário a criação de uma *Task Force* da *ERS*, em 2016, que formulou uma nova *guideline* para o diagnóstico da DCP. Esta teve o intuito de desenvolver uma diretriz baseada em evidências que determine como os resultados dos testes podem ser interpretados, de modo a poder decidir se o diagnóstico de DCP é negativo, positivo ou inconclusivo.

No entanto, até antes da reunião desta última *Task Force* as etapas seguidas até à obtenção do diagnóstico eram diferentes.

Caso se estivesse perante uma história clínica sugestiva com testes de rastreio positivos, o diagnóstico confirmatório era obtido num centro especializado, com o uso de métodos complementares de diagnóstico (*HSVA* e *TEM*).

Os testes de rastreio utilizados eram: medição do Óxido nítrico nasal, Teste da sacarina e Clearance mucociliar de aerossol radioativo. Após a obtenção de um rastreio positivo para ter a confirmação do diagnóstico de DCP era realizada a análise do padrão e frequência do movimento ciliar (por *HSVA*) e a análise da ultraestrutura ciliar (por *TEM*), sendo estas as técnicas chave para o diagnóstico da DCP. No entanto, alguns doentes possuem uma ultraestrutura ciliar normal à *TEM*, devendo por isso ser realizados mais estudos caso exista forte suspeita.

O teste de rastreio com Óxido nítrico permite sinalizar quais os pacientes com baixos níveis de *nNO* e excluir DCP principalmente em pacientes com história clínica atípica. A *ERS* recomendou apenas o seu uso em doentes com idade superior a 5 anos com suspeita de DCP.

O Teste da sacarina consiste na medição do intervalo tempo entre a introdução de uma microtablete de sacarina no corneto inferior até à sensação do seu saber, sendo que nos doentes com DCP este tempo estava geralmente prolongado. Sabia – se contudo, que era um teste de baixa especificidade e de difícil execução em crianças com menos de 12 anos, não estando por isso recomendado em crianças.

O teste de Clearance mucociliar de aerossol radioativo consiste na medição da radioatividade emitida pela albumina marcada com <sup>99</sup>Tc. Este teste apresenta sensibilidade elevada, mas baixa especificidade, não existindo experiência clínica suficiente para recomendação como teste de rastreio de rotina.

Outras técnicas de diagnóstico estavam também disponíveis caso ainda restassem dúvidas quanto ao diagnóstico após a realização de *HSVA* e *TEM*: a cultura das células ciliadas, a análise da localização da dineína por imunofluorescência e a pesquisa de mutações genéticas por genotipagem. Estas técnicas não estão por isso recomendadas como testes de diagnóstico inicial.

Com a nova *Task Force* da *ERS* responsável pela nova *guideline* de diagnóstico de DCP, o Teste da sacarina deixou de ser realizado e a Clearance mucociliar de aerossol radioativo já não faz parte dos testes de rastreio, tornando – se apenas num teste efetuado em investigações adicionais caso o diagnóstico permaneça inconclusivo apesar dos métodos diagnósticos. *HSVA* e a *TEM* mantêm o seu relevo no curso diagnóstico, no entanto passa a ser recomendado que *HSVA* seja realizado numa fase anterior ao *TEM* e aquando da medição dos valores de *nNO*. Já a genotipagem destaca- se, passando a ser o mais importante teste após resultados inclusivos com *HSVA*, *nNO* e *TEM*, sendo realizada na etapa 3.

## TASK FORCE E MÉTODOS

Em 2009 e 2014 foram criadas equipas apoiadas pela *European Respiratory Society* com o objetivo de delinear diretrizes que servissem de base ao diagnóstico da DCP. E mais recentemente, em 2016 uma nova *Task Force* reuniu – se, sendo constituída por cientistas e médicos com experiência adquirida no diagnóstico e manejo da DCP que elaboraram uma nova *guideline* para o diagnóstico de DCP.

Com a reunião de uma nova *Task Force* surgiram várias alterações no diagnóstico da DCP, alterações essas que irei abordar ao longo desta tese.

Esta *Task Force* iniciou o seu trabalho realizando a pesquisa nas bases de dados Embase e Medline (envolvendo o período compreendido entre 1 de Janeiro de 1996 e 14 de Março de 2016), tendo posteriormente selecionado os artigos que preenchessem os critérios de inclusão previamente definidos. Os estudos nos quais os doentes já tinham sido submetidos a testes de diagnóstico prévios foram excluídos, só tendo sido aceites pela *Task Force* estudos de *coorte* prospetivos, nos quais os doentes com suspeita de DCP após realização de testes diagnósticos teriam o diagnóstico confirmado/ excluído.

Foram também selecionados estudos caso – controle, que efetuavam a comparação entre doentes com DCP com outros saudáveis ou com outras patologias, no entanto estes estudos apresentam menor valor estatístico.

Cada um dos testes diagnósticos foram avaliados por um conjunto de perguntas estruturadas, o método “*PICO*”. Também foi utilizada a abordagem *GRADE* (*Grading of recommendations, Assessment, Development and Evaluation*) [13] para decidir sobre a força das recomendações [14, 15].

Para finalizar, para obter consenso sobre a confirmação ou exclusão do diagnóstico e aconselhamento a dar em caso de diagnóstico “altamente provável” ou “inconclusivo” foi realizado uma *pesquisa Delphi modificada*.

Todas estas avaliações e métodos permitiram alterar a forma como o diagnóstico passou a ser realizado. Houve exclusão de certos métodos diagnósticos (Teste da Sacarina, como já referido [16].), o uso de certos métodos em diferentes etapas das previamente estipuladas e foram também criados protocolos consensuais.

O diagnóstico passou a basear – se em 6 aspetos do diagnóstico de DCP: os sintomas clínicos, a medição dos níveis de óxido nítrico nasal, a análise de *HSAV*, a *TEM*, a genotipagem e a marcação por imunofluorescência.

Estes métodos de diagnóstico permitem determinar se o diagnóstico é positivo, “altamente provável”, “extremamente improvável” ou inconclusivo.

Atualmente, um diagnóstico é considerado positivo em caso de:

1) defeitos da ultraestrutura ciliar características de DCP (ausência de AOD, ausência combinada de IDA e ODA, ausência de IDA combinada com desarranjo microtúbulo) avaliados por *TEM*.

2) Mutações bi-alélicas não ambíguas em genes causadores de DCP.

Em doentes com história compatível de DCP, o diagnóstico de DCP é altamente provável se:

1) presença de valores muito baixos de *nNO* e *HSAV* sugestiva de DCP em três ocasiões.

2) presença de valores muito baixos de *nNO* e *HSAV* sugestiva de DCP após cultura celular.

Do mesmo modo, em casos de história altamente suspeita mas que não seja possível confirmar o diagnóstico, o diagnóstico é considerado como “altamente provável”, devendo o doente ser tratado como se sofresse de DCP. E, caso venham a surgir novos métodos diagnósticos, estes deverão ser realizados.

Um diagnóstico é “extremamente improvável” nos 2 casos seguintes:

1) em caso da suspeita clínica ser modesta, dos níveis de *nNO* altos/normais e a *HSAV* normal

2) em casos em que os níveis de *nNO* são altos/normais e a *HSAV* normal após cultura celular.

Em casos em que os pacientes não possuem critérios para serem considerados positivos, altamente prováveis ou extremamente improváveis, são então considerados inconclusivos.

## RECOMENDAÇÕES

Para cada um destes seis métodos diagnósticos foram obtidas recomendações.

Para os sintomas clínicos foram realizadas as seguintes recomendações sobre quais os pacientes que devem ser encaminhados para testes de diagnóstico:

1. Os doentes devem ser testados se apresentarem várias das seguintes características: tosse produtiva persistente; anomalias de *situs*; defeitos cardíacos congénitos; rinite persistente; doença crónica do ouvido médio com ou sem perda auditiva; uma história de sintomas do trato respiratório superior e inferior neonatais em recém – nascidos de termo ou admissão em unidade de cuidados intensivos neonatais (recomendação forte)
2. Doentes com *situs* normal mas que apresentam outros sintomas sugestivos de DCP (ver recomendação 1) devem ser encaminhados para testes de diagnóstico (recomendação forte)
3. Irmãos dos pacientes devem ser testados para DCP, particularmente se eles apresentam sintomas sugestivos de DCP (ver recomendação 1) (recomendação forte)
4. Foi também recomendado o uso de combinações de sintomas distintos de DCP e ferramentas preditivas (p.e. PICADAR) para identificar pacientes para testes de diagnóstico (recomendação fraca)

Relativamente ao Teste de óxido nítrico nasal recomendou – se que este método de diagnóstico deveria ser realizado como ferramenta de diagnóstico nos seguintes doentes:

1. Em crianças em idade escolar com idade superior a 6 anos e adultos suspeitos de ter DCP, de preferência usando um analisador de quimioluminescência com técnica de encerramento do véu do palato (recomendação forte)
2. Em crianças menores de 6 anos suspeitas de ter DCP, realizando a medição da respiração do volume corrente (recomendação fraca)
3. Doentes que apresentam uma história clínica forte devem ser submetidos a mais testes, mesmo que o óxido nítrico nasal seja normal (recomendação fraca)

Foram realizadas também recomendações relativamente ao uso de *HSVA* como ferramenta de diagnóstico:

1. *HSVA* (incluindo a frequência do batimento ciliar e a análise do padrão de batimento) deve ser usada como parte do diagnóstico em doentes suspeitos de padecer de DCP (recomendação fraca)
2. A frequência de batimento ciliar não deve ser usada sem avaliação do padrão de batimento ciliar no diagnóstico DCP (recomendação forte)
3. Para melhorar a precisão diagnóstica do *HSVA*, a avaliação de *CBF/P* deve ser repetida após a cultura *ALI* (Recomendação forte)

Quanto à *TEM*, foram obtidas as seguintes recomendações:

1. Em doentes suspeitos de sofrerem de DCP devem ser realizadas análises da ultraestrutura ciliar por *TEM* (recomendação forte)
2. Em doentes com ultraestrutura normal mas com a história clínica forte devem ser efetuadas outras investigações diagnósticas (recomendação forte)
3. Já em doentes que apresentem um defeito da ultraestrutura ciliar sinalizador de DCP, não são necessárias mais investigações diagnósticas (recomendação forte)

Relativamente à genotipagem e a imunofluorescência não houveram estudos que preenchessem os critérios de inclusão, portanto não puderam ser realizadas recomendações formais. No entanto, foram feitas declarações obtidas num acordo entre especialistas.

## ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

Após a realização de recomendações foi criado um algoritmo de diagnóstico (figura 1), usando a abordagem *Delphi* modificada, o qual define o diagnóstico como positivo, altamente provável, extremamente improvável ou inconclusivo. Doentes com diagnóstico positivo, altamente provável e extremamente improvável não necessitam de ser submetidos a mais métodos diagnósticos.

O algoritmo divide-se em 3 etapas, não sendo obrigatório a passagem por todas elas, como se pode ver na seguinte figura 1.

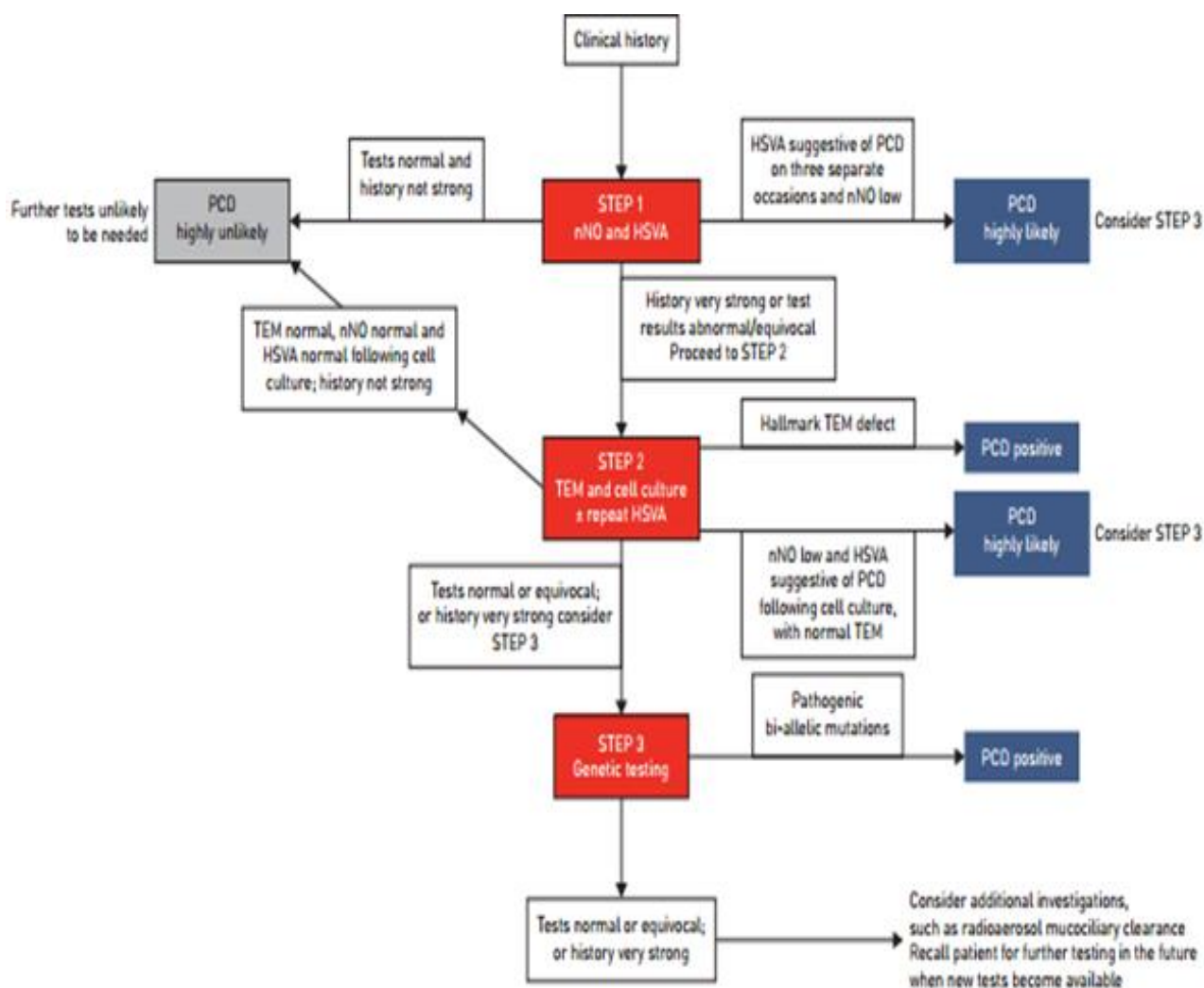


Figura 1 – Algoritmo de diagnóstico. Adaptado de Lucas JS, Barbato A, Collins SA *et al*, Eur Respir J 2016.



Na etapa 1 é realizada a medição de *nNO* e *HSAV*. Se estes forem normais, o diagnóstico será altamente improvável, sendo desnecessária a realização de mais testes. No entanto, se a clínica for muito sugestiva mais testes são requeridos.

Se o valor obtido para *nNO* é baixo e /ou se *HSAV* for anormal, o diagnóstico de DCP é provável/ possível. Nesse caso, devem ser repetidos os testes da etapa 1 e caso sejam positivos, prossegue – se para a etapa 2.

Na etapa 2 realiza – se a *TEM*. Se este teste mostrar defeitos de “marca registrada” o diagnóstico está confirmado, podendo realizar – se o teste de genética para caracterização mais aprofundada do defeito subjacente. No entanto, caso a *TEM* for normal está recomendado a repetição da *HSAV* após a cultura celular, podendo -se também considerar o teste genético para detecção de genes que estejam associados a exame de *TEM* normal ou com defeitos subtis.

Caso os outros testes diagnósticos não tenham conseguido fornecer um resultado diagnóstico definitivo, prossegue – se para a etapa 3, onde são realizados testes genéticos.

Caso, ainda assim o diagnóstico permaneça inconclusivo, pode – se considerar investigações adicionais como a imunofluorescência ou análise da clearance mucociliar de aerossol radioativo. O médico deve ainda informar o paciente de possibilidade de realização de novos testes diagnósticos assim que se tornem disponíveis.

Não houve consenso sobre a existência de algum teste ou testes que isolado ou em conjunto pudessem determinar um diagnóstico como conclusivo (ou seja, como 100% certo) ou tão pouco, que permita a exclusão inequívoca do diagnóstico.

## OS SEIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Segue - se uma abordagem mais pormenorizada aos seis métodos diagnósticos atualmente usados para o diagnóstico da DCP.

### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Através dos estudos efetuados chegou- se à conclusão que as características clínicas podem ajudar a confirmar ou excluir o diagnóstico, tendo – se usado a tosse produtiva iniciada na primeira infância como critério de seleção inicial. Provou – se igualmente ser necessário a combinação de vários sintomas clínicos para melhor discriminação diagnóstica.

A literatura com valor estatístico que permita descobrir quais as características clínicas que preveem um diagnóstico positivo foi escassa: apenas 2 estudos, de BEHAN *et al* [17] e SHAPIRO *et al* [18]. O estudo de BEHAN *et al* é particularmente importante uma vez que determinou a sensibilidade e especificidade para 25 características clínicas (tabela 2) e ainda desenvolveu a primeira ferramenta que permite fazer uma previsão da probabilidade dum paciente com tosse persistente produtiva possuir DCP: a PICADAR. Este corresponde a um questionário de 7 pontos, em que a pontuação possível pode ir de 0 a 14 pontos.

Aquando da interpretação de resultados deve ser dada relevância a determinados aspetos: como o facto do valor preditivo de alguns sintomas poder diferir consoante a região geográfica. Um exemplo é o das bronquiectasias, comuns na África subsaariana e menos frequentes em países desenvolvidos, local onde foram realizados estes estudos.

### TESTE DE ÓXIDO NÍTRICO NASAL

Em doentes com DCP sabe – se (embora não se compreenda a causa), que a concentração de óxido nítrico no ar expirado é extremamente baixo, embora ainda não haja consenso para o valor do *cut- off* positivo ou negativo.

Com este teste não é possível por si só confirmar ou excluir o diagnóstico de DCP. No entanto, o facto de ser uma técnica acessível, não – invasiva e de execução fácil faz dela uma das técnicas escolhidas pela *Task Force* para figurar como teste de diagnóstico.

Dos estudos identificados, 4 artigos serviram de base à realização de recomendações. Nesses 4 estudos de Marthin *et al*, Leigh *et al*, Beydon *et al* e Jackson *et al* [19,20,21,22], realizaram -se a medição de *nNO* segundo os seguintes métodos: ao sustentar a respiração,

respiração de volume corrente, expiração forçada ou encerramento do véu do palato. Estão resumidos a sensibilidade e especificidade para cada método de medição de *nNO* na seguinte tabela 1.

First author [ref.]	Study population	Sampling method	Threshold nL.min <sup>-1</sup>	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
MARTHIN [24]	117 referrals (PCD: n=14)	Breath hold: n=58	52.5	0.92 (0.62–0.998)	0.96 (0.85–0.995)
		Oral exhalation against resistance: n=37	72.6	1.0 (0.54–1.0)	0.94 (0.79–0.99)
LEIGH [25]	155 referrals (PCD: n=71; indeterminate: n=84)	Tidal breathing: n=97	47.4	0.93 (0.66–0.998)	0.80 (0.69–0.88)
		Oral exhalation, velum closure: n=155	77	0.99 (0.92–0.9996)	0.75 (0.64–0.84)
BEYDON [22]	86 referrals: (PCD: n=49; non-PCD: n=37)	Velum closure: n=74	82.2	0.91 (0.79–0.98)	0.86 (0.68–0.96)
				0.90 (0.78–0.97)	0.97 (0.86–0.999)
JACKSON [26]	301 referrals: (PCD: n=34; non-PCD: n=267)	Tidal breathing (five peaks): n=86	40		
		Velum closure (breath hold or oral exhalation): n=301	30	0.90 (0.74–0.98)	0.95 (0.90–0.98)

Tabela 1 - Resumo da avaliação da precisão diagnóstica na medição de *nNO* em doentes suspeitos de sofrerem de DCP. Adaptado de Lucas JS, Barbato A, Collins SA *et al*, Eur Respir J 2016.

Pareceu ficar aceite com os estudos realizados que o melhor método de análise será com a utilização de um analisador de quimioluminescência estacionária usando técnicas de encerramento do véu do palato, correspondendo ao atual “*gold standard*”. No entanto, a técnica de respiração de volume corrente ou o uso de analisadores portáteis apesar de apresentarem menor sensibilidade e especificidade, poderão contribuir para a confirmação ou exclusão do diagnóstico.

Nas crianças saudáveis abaixo dos 12 anos, o *nNO* é inversamente proporcional à idade, o que poderá dificultar a diferenciação entre crianças saudáveis e crianças com DCP. Outro fator que dificulta esta diferenciação é a dificuldade que crianças pequenas apresentam em executar certas técnicas como o uso de analisador de quimioluminescência estacionário, já que este pressupõe a aspiração do gás através de uma das narinas, operação que não é realizada com facilidade por parte de crianças pequenas. No entanto, a partir dos 3.9 anos ficou demonstrado, por um estudo, que já conseguiriam realizar a técnica de encerramento do véu do palato.

Nos casos em que tal não seja possível, dever – se – á optar pela respiração corrente.

## ANÁLISE DE VÍDEO – MICROSCOPIA DE ALTA VELOCIDADE

Para saber se a *HSVA* deve ser usada como uma ferramenta de diagnóstico foram identificados 2 estudos de Papon *et al* [23] e Jackson *et al*, que serviram de base à realização de recomendações.

No estudo de Papon *et al* foram calculados a sensibilidade e especificidade para 12 parâmetros de padrão de batimento ciliar, estando os resultados evidenciados na seguinte tabela 2.

First author [ref.]	Study population	Cilia assessment method		Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
PAPON [42]	25 referrals (10 PCD positive)	HSVA beat frequency and quantitative measurements of beat pattern		0.96 [0.89–0.98]	0.95 [0.91–0.98]
JACKSON [26]	625 referrals (60 PCD positive)	HSVA beat frequency and subjective pattern		1.0 [0.94–1.00]	0.93 [0.91–0.95]
JACKSON [26]	301 referrals: [PCD: n=34; non-PCD: n=267]	Velum closure (breath hold or oral exhalation): n=301	30	0.90 [0.74–0.98]	0.95 [0.90–0.98]

Tabela 2 - Resumo da avaliação da precisão diagnóstica com *HSVA* em doentes suspeitos de sofrerem de DCP. Adaptado de Lucas JS, Barbato A, Collins SA *et al*, Eur Respir J 2016.

O parâmetro que obteve melhor sensibilidade e especificidade (0.96 e 0.95 respetivamente) correspondia à distância percorrida pela ponta dos cílios em ponderação com o numero de batimentos. Já no estudo de Jackson *et al* foi utilizado a combinação da frequência e padrão de batimento ciliar como parâmetro, tendo – se obtido uma sensibilidade e especificidade de 1.00 e 0.93, respetivamente.

Mais estudos permitiram chegar a outras conclusões. Ficou assim provado que o padrão de batimento ciliar é um parâmetro mais sensível e específico que a frequência de batimento ciliar no diagnóstico de DCP [24] e que a frequência de batimento ciliar apenas consegue diferenciar adequadamente pacientes com DCP de controlos saudáveis quando usada em combinação com o padrão de batimento ciliar [25].

Além disso, foi objetivado que o uso isolado da frequência pode ser enganadora, isto porque pode co- existir uma frequência aumentada num paciente com DCP. Isto acontece porque a existência de diferentes genótipos condiciona diferentes frequências possíveis.

Outros estudos permitiram também associar um determinado defeito com determinado padrão de batimento ciliar. Assim sendo, um defeito isolado do braço externo da dineína ou em combinação com defeitos do braço interno da dineína ocasionam cílios praticamente imóveis, enquanto que defeitos isolados do braço interno da dineína associam – se a um padrão de batimento rígido. Estes resultados são apresentados no estudo de Chilvers *et al* [26].

Concluiu – se também que diferentes mutações estão associadas a diferentes fenótipos: as mutações (DNAH5, DNAI1, DNAI2, ARMC4) estão associados à presença de pequenos movimentos residuais. Já a mutação DNAH11 apresenta uma ultraestrutura normal mas associa – se a um padrão de batimento ciliar hipercinético com flexão axonemal proximal reduzida.

## MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE TRANSMISSÃO

Uma percentagem muito baixa de falsos positivos e uma especificidade muito elevada fazem da *TEM* um exame com forte recomendação não sendo, no entanto, capaz por si só de excluir o diagnóstico. Isto deve – se ao facto de nem todos os subtipos genéticos (como a mutação DNAH11) poderem ser diagnosticados por *TEM*, nomeadamente os que apresentam uma ultraestrutura ciliar normal. Isto fez com que deixasse de ser o “*gold standard*”, como anteriormente sucedia.

Para saber a utilidade da *TEM* no diagnóstico de DCP, foram identificados 11 estudos que contribuíram para a realização de recomendações. Nas tabelas 5 e 6 encontram -se resumidos a taxa de sensibilidade e especificidade obtidos para cada estudo.

Outros estudos permitiram concluir que os defeitos mais frequentes são os defeitos do braço externo de dineína (incluindo a sua ausência deste) e defeitos combinados do braço interno e externo da dineína (ausência combinada dos 2 também incluída). Também são visualizados, embora menos frequentemente, perda do par microtubular central ou desorganização dos microtúbulos duplos.

## GENOTIPAGEM

Devido à falta de estudos representativos, a *Task Force* não chegou a nenhuma conclusão quanto à precisão da genotipagem para confirmar/ excluir o diagnóstico de DCP. Estes testes só estão recomendados em casos em que a confirmação da DCP é difícil com outros testes ou em casos de alta suspeita de DCP (tabela 8).

Atualmente são conhecidos aproximadamente 30 genes implicados na doença, sendo que os estudos sugerem que estes são identificados em cerca de 50% a 75% dos casos, sendo provável que esta percentagem aumente com a identificação de mais genes.

Esta identificação de novos genes é geralmente realizada com a ajuda da *TEM*, em que após a deteção do defeito ultra-estrutural seria posteriormente avaliado o genótipo do doente. Isto significa que a maioria dos genes identificados até à data correspondem a defeitos que se refletem estruturalmente. Também a imunofluorescência e *HSAV* podem ser usadas para documentar associações entre o genótipo e o fenótipo na DCP.

Atualmente conhecem-se algumas manifestações fenotípicas relacionadas com algumas mutações. Sabe-se que as mutações *DNAH5* e *DNAH11* estão associados a cílios estáticos, podendo a última mutação estar também associada a cílios rígidos com alta frequência de batimento. As mutações *DNAH5* e *DNAI1* estão associadas a defeitos no braço externo da dineína, enquanto que as mutações *CCDC39* e *CCDC40* estão associadas à falta do braço interno da dineína e a desorganização microtubular.

## IMUNOFLUORESCÊNCIA

Dos estudos que a *Task Force* analisou nenhum abordou a imunofluorescência como potencial teste de diagnóstico. Chegou-se também à conclusão de que vários anticorpos não estão indicados para uso diagnóstico, exigindo-se assim validação antes do seu uso. Desconhece-se assim a sensibilidade e especificidade deste teste, sendo que estão dependentes da qualidade destes anticorpos. Mais anticorpos deverão ser identificados no futuro, expandindo o uso deste teste.

Todas estas limitações devem ser ultrapassadas de modo a que a imunofluorescência possa ser usada como teste de diagnóstico, aproveitando-se a facilidade de manuseio e o baixo custo que possui comparativamente a outros testes. Esta técnica consegue detetar todas as alterações sinalizadas por *TEM* e ainda outras em que *TEM* se apresenta normal.

O objetivo deste teste de diagnóstico será correlacionar determinada alteração de uma proteína com o respetivo defeito genético de base, permitindo aumentar o conhecimento fisiopatológico sobre mutação em causa.

Um resumo do consenso obtido sobre esta técnica encontra – se na tabela 9.

## DESCRIÇÃO DA METODOLOGIA

Apresento um resumo com o objetivo de permitir compreender a metodologia envolvida na realização/ análise dos métodos diagnósticos.

A medição de *nNO* é realizada por quimioluminescência e obtida por expiração contra resistência a partir do nariz, durante o encerramento do véu do palato. O valor de *nNO* (nL / min) é calculado posteriormente, multiplicando a concentração de *nNO* (partes por bilhão) pela percentagem de fluxo de *nNO* por unidade de tempo.

No que diz respeito à *TEM*, a biópsia é imersa em uma solução de glutaraldeído e posteriormente processada para investigação ultra-estrutural. As secções transversais dos cílios são então examinadas para identificar defeitos específicos.[27]

Atualmente encontram - se disponíveis várias formas de melhoramento da técnica: análise assistida por computador, o uso da tomografia eletrônica ou de técnicas de cultura de células. A análise assistida por computador possibilita o aumento da sensibilidade ao permitir uma melhor visualização dos braços de dineína [28], já a tomografia eletrônica possibilita a obtenção de imagens a três dimensões e posterior comparação por correlação cruzada das características em comum. Relativamente à técnica de cultura ciliar, existem 2 formas possíveis para induzir a ciliogênese: técnica de cultura submersa ou técnica por interface ar – líquido. Isto permite distinguir defeitos secundários ciliares de defeitos primários.

Também a colheita de amostra e realização de análise por *HSAV* obedece a certas regras. O epitélio respiratório é colhido dos brônquios ou mais frequentemente do nariz, podendo ser usado a escova, fórceps ou cureta. De seguida é sujeito a técnicas de amostragem e posteriormente a técnicas de cultura celular para diferenciar entre DCP e Discinesia Ciliar secundária. Numa fase seguinte é analisado em vídeo, por microscopistas experientes, quer a frequência como o padrão de batimento ciliar, tanto em velocidades elevadas (120-500fps) como lentas (30-60fps).

Relativamente à imunofluorescência, o método de análise é o seguinte: após colheita das células epiteliais respiratórias, estas são depositadas em lâminas de vidro, sujeitas a fixação e incubadas com anticorpos quer direcionados a estruturas normais do cílio quer dirigidos a defeitos estruturais de células ciliares com DCP. Por exemplo, os anticorpos dirigidos contra GAS8 identificam defeitos do complexo nexina-dineína e anticorpos



dirigidos contra DNAH5 identificam defeitos de proteínas do braço externo da dineína, observados por *TEM*.

## DISCUSSÃO

Algumas deficiências foram relatadas no decorrer da revisão levada a cabo pela *Task Force*. O facto de nenhum teste diagnóstico estar padronizado internacionalmente, ocasionou que cada pesquisador pudesse escolher um método aquando da realização do seu estudo, o que origina uma falta de poder comparativo entre ensaios clínicos. Para ultrapassar este problema, deverão ser definidos padrões internacionais baseados em evidências para a realização dos estudos e posterior relato de resultados.

Relativamente ao uso das características clínicas como método diagnóstico reconhece – se a necessidade de um maior número de estudos de *coorte* prospetivos (dada a escassez de literatura relevante encontrada). Também se considera importante que no momento da análise dos dados se faça a estratificação de acordo com a idade e gravidade de sintomas, o que não foi realizado nos estudos que contribuíram para a revisão bibliográfica.

Quanto ao exame *TEM* foi apontada a necessidade de introdução de protocolos padronizados quanto à técnica de colheita de amostras e de obtenção de valores fidedignos quanto à prevalência de defeitos genéticos raros. O facto da *TEM* ser usada como padrão de referência também cria um viés já que faz com que sejam excluídos pacientes com ultraestrutura normal.

Em relação à *HSVA*, as normas de processamento atuais são bastante díspares: a temperatura e o Ph da avaliação das amostras varia de centro para centro, o que leva obter diferentes resultados para a função ciliar. Para melhorar a interpretação destes testes é obrigatório padronizar o método de processamento celular e de avaliação/ interpretação ciliar e garantir que amostra é avaliada por profissionais experientes. O aumento do conhecimento genótipo- fenótipo associado, é também necessário, sendo sobretudo útil em casos de dúvida aquando do diagnóstico.

Também o uso da genotipagem como padrão de referência leva a que sejam excluídos pacientes com mutações genéticas não conhecidas.

Para além das alterações passíveis de serem realizadas já mencionadas, estes testes também só deverão ser realizados por especialistas e laboratórios com experiência. O investigador deve ainda ter o cuidado de melhorar a notificação do fenótipo clínico apresentado e de investigar mais cuidadosamente o impacto do diagnóstico para o paciente na sua qualidade de vida.

## CONCLUSÃO

Podemos concluir que a forma de efetuar o diagnóstico de DCP mudou substancialmente com o surgimento das *guidelines* para o diagnóstico de DCP da *European Respiratory Society* de 2016.

O diagnóstico carecia de fundamento científico que validasse a opção de escolha por determinado método diagnóstico em detrimento de outro em determinado *timing* do processo diagnóstico. Para além disso, não existiam recomendações formais sobre cada um dos métodos diagnósticos nem tampouco um algoritmo diagnóstico, o que muito facilita a aplicação prática desta nova abordagem diagnóstica.

Assim sendo, esta *Task Force* executou o trabalho que necessitava ser realizado, analisou cada um dos seis métodos diagnósticos: recolheu a devida bibliografia disponível, analisou pelo método “*PICO*” e segundo a abordagem *GRADE*. A partir destas foi possível elaborar recomendações e, posteriormente, com o uso da *pesquisa Delphi* foi obtido um algoritmo diagnóstico. Enumerou também as condições para que o diagnóstico fosse considerado positivo, “altamente provável”, “extremamente improvável” ou inconclusivo.

Este trabalho realizado pela *Task Force* veio reafirmar a necessidade de combinação de diferentes métodos de diagnóstico para obtenção de conclusões credíveis, isto porque, apesar dos avançados métodos diagnósticos disponíveis nenhum método permite excluir ou confirmar o diagnóstico de DCP com 100% de certeza, ou seja, mantém – se a carência de um “*gold standard*”.

Com o aumento de novos fenótipos descobertos, com o aperfeiçoamento dos testes existentes e o desenvolvimento de outros novos, surgirá a necessidade de rever e atualizar as diretrizes seguidas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Krawczynski MR, Witt M. PCD e RP: herança de ambas as doenças ligadas ao X? *Pediatr Pulmonol* 2004; 38: 88-89
- 2 Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976; 193: 317–319.
- 3 Sleigh MA. Primary ciliary dyskinesia. *Lancet* 1981; 2: 476.
- 4 Lundberg JO. Nitric oxide and the paranasal sinuses. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291: 1479–1484.
- 5 Walker WT, Jackson CL, Lackie PM, et al. Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2012; 40: 1024–1032.
- 6 Knowles MR, Ostrowski LE, Leigh MW, et al. Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 707–717.
- 7 Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK, et al. Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc* 2013; 10: 574–581.
- 8 Collins SA, Gove K, Walker W, et al. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2014; 44: 1589–1599.
- 9 Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, et al. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 913–922.
- 10 Chilvers MA, Rutman A, O’Callaghan C. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 518–524.
- 11 Hirst RA, Jackson CL, Coles JL, et al. Culture of primary ciliary dyskinesia epithelial cells at air-liquid interface can alter ciliary phenotype but remains a robust and informative diagnostic aid. *PLoS One* 2014; 9: e89675.
- 12 Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B. Ciliary function analysis for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: advantages of ciliogenesis in culture. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 291–295
- 13 Schünemann HJ, Oxman AD, Brozek J, et al. Grading quality of evidence and strength of recommendations for diagnostic tests and strategies. *BMJ* 2008; 336: 1106–1110.
- 14 Balshem H, Helfand M, Schünemann HJ, et al. GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence. *J Clin Epidemiol* 2011; 64: 401–406.
- 15 Andrews JC, Schünemann HJ, Oxman AD, et al. GRADE guidelines: 15. Going from evidence to recommendation: determinants of a recommendation’s direction and strength. *J Clin Epidemiol* 2013; 66: 726–735.
- 16 Barbato A, Frischer T, Kuehni CE, et al. Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children. *Eur Respir J* 2009;34:1264–76
- 17 Behan L, Dimitrov BD, Kuehni CE, et al. PICADAR: a diagnostic predictive tool for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2016; 47: 1103–1112.

- 18 Shapiro AJ, Chawla KK, Baker BR, et al. Nasal nitric oxide and clinical characteristics of patients with heterotaxy: comparison to primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: A1209.
- 19 Marthin JK, Nielsen KG. Choice of nasal nitric oxide technique as first-line test for primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2011; 37: 559–565.
- 20 Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK, et al. Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc* 2013; 10: 574–581.
- 21 Beydon N, Chambellan A, Alberti C, et al. Technical and practical issues for tidal breathing measurements of nasal nitric oxide in children. *Pediatr Pulmonol* 2015; 50: 1374–1382.
- 22 Jackson CL, Behan L, Collins SA, et al. Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2016; 47: 837–848.
- 23 Papon J-F, Bassinet L, Cariou-Patron G, et al. Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 78.
- 24 Jorissen M, Willems T, Van der Schueren B. Ciliary function analysis for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: advantages of ciliogenesis in culture. *Acta Otolaryngol* 2000; 120: 291–295.
- 25 Stannard WA, Chilvers MA, Rutman AR, et al. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 307–314.
- 26 Chilvers MA, Rutman A, O’Callaghan C. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 518–524.
- 27 Sturgess JM, Turner JA. Ultrastructural pathology of cilia in the immotile cilia syndrome. *Perspect Pediatr Pathol* 1984; 8: 133–161.
- 28 Escudier E, Couprie M, Duriez B, et al. Computer-assisted analysis helps detect inner dynein arm abnormalities. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1257–1262.

TABLE 2 Summary of reported clinical manifestations in studies included in the quantitative analysis

Clinical manifestation	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
<b>Neonatal manifestations</b>		
Neonatal chest symptoms	0.75 (0.63–0.84)	0.83 (0.79–0.84)
Neonatal rhinitis	0.27 (0.17–0.38)	0.94 (0.91–0.95)
Neonatal respiratory support	0.41 (0.30–0.53)	0.93 (0.90–0.95)
Neonatal unit admission	0.61 (0.49–0.72)	0.86 (0.83–0.89)
<b>Upper respiratory manifestations after the post-natal period</b>		
Chronic rhinitis	0.81 (0.70–0.89)	0.43 (0.38–0.47)
Chronic serious otitis media	0.57 (0.45–0.69)	0.81 (0.77–0.84)
Chronic acute otitis media	0.33 (0.23–0.45)	0.75 (0.71–0.79)
Hearing loss	0.49 (0.38–0.61)	0.84 (0.81–0.87)
Chronic ear perforation	0.12 (0.06–0.22)	0.91 (0.88–0.93)
Ear surgery	0.32 (0.22–0.44)	0.86 (0.82–0.88)
Chronic sinusitis	0.28 (0.19–0.40)	0.76 (0.72–0.79)
<b>Lower respiratory manifestations after the post-natal period</b>		
Chronic wet cough	0.93 (0.84–0.98)	0.15 (0.12–0.18)
Recurrent wheeze	0.48 (0.36–0.60)	0.62 (0.57–0.65)
Previous pneumonia	0.41 (0.30–0.53)	0.65 (0.61–0.69)
Bronchiectasis	0.29 (0.20–0.41)	0.68 (0.64–0.72)
<b>Other manifestations (various ages)</b>		
Situs anomalies <sup>#</sup>	0.51 (0.46–0.56)	0.94 (0.92–0.95)
Congenital heart disease	0.08 (0.03–0.17)	0.98 (0.97–0.99)
Developmental delay	0.11 (0.05–0.20)	0.94 (0.91–0.96)
Hydrocephalus	0.01 (0.00–0.08)	0.99 (0.98–1.00)
Subfertility <sup>†</sup>	0.91 (0.57–1.00)	0.82 (0.74–0.87)
<b>Family history (any age)</b>		
Primary ciliary dyskinesia in siblings	0.24 (0.15–0.35)	0.98 (0.97–0.99)
Primary ciliary dyskinesia in extended family	0.05 (0.02–0.14)	0.99 (0.97–1.00)
Asthma	0.16 (0.09–0.27)	0.66 (0.62–0.70)
Bronchiectasis	0.04 (0.01–0.12)	0.96 (0.93–0.97)
Otitis media	0.07 (0.02–0.16)	0.89 (0.86–0.92)
<b>Clinical scores</b>		
PICADAR score >5	0.90 (0.81–0.96)	0.75 (0.70–0.80)

All data from BEHAN *et al.* [10] (641 eligible referrals, 75 (12%) had primary ciliary dyskinesia). <sup>#</sup>: data on situs anomalies are from BEHAN *et al.* [10] and SHAPIRO *et al.* [11] (767 referrals); <sup>†</sup>: data on subfertility are from a subgroup of 152 referrals where 11 (7%) had primary ciliary dyskinesia.

TABLE 5 Characteristics of the ultrastructural defects described in nine studies directly addressing the PICO question using transmission electron microscopy to diagnose primary ciliary dyskinesia

	PAPON [54]	STANNARD [48]	OLIN [58]	SHOEMARK [56]	BOON [59]	JACKSON [26]	Total
Subjects n	190	68	155	214	138	57	
Isolated outer dynein arm defect	33	26	54	41	59	46	44
Inner and outer dynein arm defect	32	34	23	24	6	39	25
Inner dynein arm with microtubular disorganisation	13	6	7	9	16	9	10
Isolated inner dynein arm defect	4	21	15	13	0	0	9
Central pair defect	19	13	1	12	14	7	8
Other <sup>#</sup>		3			5		1
Total n	190	68	155	214	138	57	

Data are presented as percentage, unless otherwise stated. <sup>#</sup>: include ciliary aplasia, disorientation and extra microtubules.

TABLE 6 Sensitivity and specificity of the 11 studies directly addressing the PICO question using transmission electron microscopy to diagnose primary ciliary dyskinesia

First author [ref.]	Study population n	Conclusive diagnostic result reached n	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
JORISSEN [37]	812	468	0.71 (0.61–0.81)	1.0 (0.99–1.0)
PIFFERI [52]	64	62	0.75 (0.48–0.93)	1.0 (0.93–1.0)
PIFFERI [39]	59	56	0.77 (0.50–0.93)	1.0 (0.91–1.0)
HIRST [53]	231	187	1.0 (0.88–1.0)	1.0 (0.98–1.0)
PAPON [54]	1149	793	0.82 (0.77–0.86)	1.0 (0.99–1.0)
OLM [55]	24	24	0.92 (0.62–1.0)	1.0 (0.74–1.0)
PAPON [42]	34	28	0.83 (0.52–0.98)	1.0 (0.79–1.0)
SHOEMARK [56]	1182	1031	0.88 (0.83–0.91)	1.0 (1.0–1.0)
HIRST [40]	165	122	0.96 (0.87–1.0)	1.0 (0.95–1.0)
MUNKHOLM [57]	239	61	0.83 (0.61–0.95)	0.92 (0.79–0.98)
JACKSON [26]	868	368	0.79 (0.68–0.88)	1.0 (0.99–1.0)

**TABLE 8 Summary of the Task Force consensus on the published evidence on genetic testing in primary ciliary dyskinesia (PCD) diagnostics**

Whilst further evidence in a diagnostic setting is required, experts of the Task Force agreed:

1. Genetic testing to confirm diagnosis can be performed in PCD individuals diagnosed by other means (e.g. HSVA, TEM, IF) or in individuals with high clinical suspicion for PCD (typical clinical findings, low nNO) and no availability of other investigations, such as HSVA, TEM or IF. A negative genetic test does not exclude PCD.
2. Genetic testing can also be performed to establish diagnosis in patients highly suspected of PCD and in whom HSVA, TEM or IF failed to confirm the diagnosis, as can be the case for patients with *DNAH11*, *CCNO*, *MCIDAS* or *RSPH* gene mutations.
3. Genetic testing and interpretation of results should follow national and international best practice guidelines [114, 115].
4. Genetic diagnosis has to be consistent with the clinical and TEM/IF/HSVA phenotype, or diagnosis reconsidered if the picture is inconsistent.
5. Allelic segregation analysis within the family (especially in both parents) is important to confirm the genotype in the probands (to differentiate between homozygosity and hemizyosity, and between compound heterozygosity and a complex allele).
6. Genetic testing in probands and in their relatives is helpful for genetic counselling to inform reproductive choices.
7. In the future genetic testing might be important for genotype specific therapy.

---

HSVA: high-speed video microscopy analysis; TEM: transmission electron microscopy; IF: immunofluorescence; nNO: nasal nitric oxide.

---

**TABLE 9 Summary of the Task Force consensus on the published evidence on immunofluorescence testing in primary ciliary dyskinesia (PCD) diagnostics**

Whilst further evidence in a diagnostic setting is required, experts of the Task Force agreed:

1. Immunofluorescence is able to confirm pathogenesis of mutations (e.g. missense mutations in genes encoding radial spoke proteins)
  2. Immunofluorescence can detect PCD in some cases with normal ultrastructure or subtle ultrastructural defects
  3. Immunofluorescence can help establish the diagnosis of PCD in outer and inner dynein arms, tubular disorganisation (*CCDC39/CCDC40* mutations), central pair (genes encoding radial spoke proteins) and nexin link defects
-